

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. E. Schütte

Die Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff und Phenobarbital auf einige steroidabbauende Reaktionen
der Rattenleber,

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

1972

vorgelegt von
Gerhart Köster
aus Schmolde

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. E. Schütte

Die Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff und Phenobarbital auf einige steroidabbauende Reaktionen
der Rattenleber.

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gerhart Köster
aus Schmolde

Referent: Professor Dr.rer.nat. Dipl.-Chem. Martin W e n z e l

Korreferent: Professor Dr.med. Eckard O b e r d i s s e



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26.4.1972

1.	Einleitung	S.2
2.	Methodik	S.5
3.	Ergebnisse	
3.1.	Versuche nach CCl_4 -Vorbehandlung	
3.1.1.	In vivo-Versuche zur Oxidation an C-17	S.10
3.1.2.	Inkubationsversuche zur Oxidation an C-17	S.10
3.1.3.	Versuche zur Oxidation an C-17 in Zell- fraktionen	S.11
3.1.4.	Inkubationsversuche zur Wasserstoffüber- tragung	S.13
3.1.5.	In vivo-Versuche zur Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7	S.14
3.1.6.	Inkubationsversuche zur Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7	S.15
3.2.	Versuche nach Phenobarbitalvorbehandlung	
3.2.1.	In vivo-Versuche zur Oxidation an C-17	S.17
3.2.2.	Inkubationsversuche zur Oxidation an C-17	S.17
3.2.3.	Inkubationsversuche zur Wasserstoffüber- tragung	S.18
3.2.4.	In vivo-Versuche zur Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7	S.18
3.2.5.	Inkubationsversuche zur Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7	S.19
4.	Diskussion	S.20
5.	Abbildungen und Tabellen	S.29
6.	Zusammenfassung	S.39
7.	Literatur	S.40

1. Das endoplasmatische Retikulum der Leberzelle ist unter anderem der wichtigste Ort für die Inaktivierung der Sexualhormone Östradiol und Testosteron.

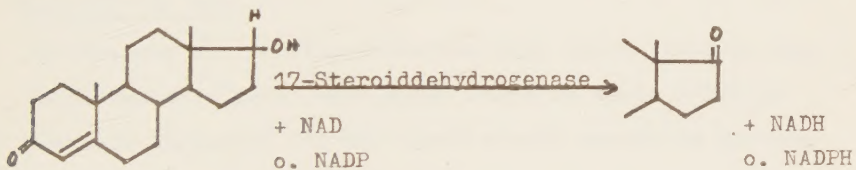
Die Inaktivierung findet hier hauptsächlich durch Hydroxylierung, Hydrierung von Doppelbindungen, oxidativen Abbau sowie Konjugierung an Schwefelsäure und Glucuronsäure statt. Durch Stoffe, die das endoplasmatische Retikulum proliferativ oder degenerativ beeinflussen, müßten sich entsprechende Veränderungen im Leberstoffwechsel dieser Hormone bewirken lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde Tetrachlorkohlenstoff als Prototyp eines das endoplasmatische Retikulum degenerativ beeinflussenden Stoffes benutzt.

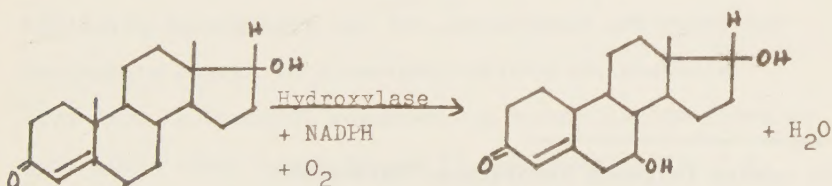
Die Ursache der Hepatotoxizität des CCl_4 ist noch ungeklärt (Übersicht bei 19). Als gesichert gilt, daß CCl_4 am endoplasmatischen Retikulum durch mikrosomale Enzyme zum toxischen Radikal giftet wird (6,13,19) und erst in dieser Form das endoplasmatische Retikulum zu schädigen vermag. Als Schädigungsmechanismen werden u.a. die erhöhte Lipidperoxidation der endoplasmatischen Membranen (7,8,19), sowie die Schädigung des Cytochroms P 450 (13) diskutiert. Hierbei könnte die verringerte Aktivität des Cytochroms P 450 als Erklärung für die verminderte hydroxylierende Enzymleistung des endoplasmatischen Retikulums (13,14) nach der CCl_4 -Schädigung dienen, da Cytochrom P 450 wahrscheinlich den dafür erforderlichen Sauerstoff aktiviert.

Als das endoplasmatische Retikulum proliferativ beeinflussenden Stoff wurde in dieser Arbeit Phenobarbital benutzt.

Phenobarbital vermehrt bei verschiedenen Tierspezies die Aktivität mikrosomaler Enzyme, die am Stoffwechsel des Barbiturates selbst (9), sowie am Abbau anderer exogener und endogener Stoffe beteiligt sind (Übersicht bei 39). Diese Enzyminduktion ist relativ unspezifisch, sie erstreckt sich auch auf eine große Anzahl anderer Substrate mikrosomaler Enzyme und betrifft auch extramikrosomale Enzyme. (55). Auch hier ist es noch offen, auf welche Weise die Aktivitätsvermehrung dieser Enzyme bewirkt wird (41). Diskutiert werden u.a. eine vermehrte Eiweißsynthese der Ribosomen (41,42) bzw. ein verringerter Abbau mikrosomalen Proteins (42), woran eine Vermehrung von Cytochrom P 450 (27) und der NADPH-Cytochrom C Reduktase (38) gebunden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von CCl_4 und Phenobarbital auf zwei steroidabbauende Reaktionen der Leberzelle untersucht. Hierbei handelt es sich um die Oxidation an C-17



und um die Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7.



Die zuletzt genannte Reaktion ist von besonderem Interesse, weil sie nicht nur zu einem Verlust an biologischer

Aktivität führt, sondern auch durch zahlreiche Pharmaka induzierbar ist (32).

Der Nachweis dieser Induktion ist bis jetzt zum größten Teil in vitro oder im Tierversuch geführt worden. Im Folgenden wird u.a. eine Methode beschrieben, die den in vivo-Nachweis arzneimittelinduzierter Hydroxylasen auch in der Humanmedizin gestattet.

Es wurden folgende Abkürzungen verwendet:

HTO = tritiiertes Wasser

NAD = Nicotinamidadenindinucleotid

NADP = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat

2. Material und Methodik

Tiere

Es wurden männliche und weibliche Wistarratten eines haus-eigenen Inzuchtstammes verwendet. Ihre Gewichte lagen zwischen 200 - 300 g. Die Tiere erhielten eine Standard-kost und Trinkwasser ad libitum.

Steroide

Es wurden folgende radioaktiv markierten Steroide benutzt: 7-T-Testosteron (520 mCi/mMol), 17-T-Testosteron (172 mCi/mMol), ^{14}C -Testosteron (29 mCi/mMol), 6,7-T-Östradiol (415 mCi/mMol), 17-T-Östradiol (98 mCi/mMol), ^{14}C -Östradiol (32 mCi/mMol), ^{14}C -Androstendion (37 mCi/mMol).

Die radioaktiven Steroide wurden von der NEN GmbH, Dreieichenhain, von der Schering AG, Berlin und vom Radiochemical Ctr., Amersham bezogen. Die inaktiven Steroide stellte die Schering AG, Berlin zur Verfügung.

Messung von HTO

Zur Messung der in vivo-Oxidation oder Hydroxylierung der "stoffwechsel-labil" markierten Steroide wurde folgende Methodik angewandt (1): Die Tiere wurden paarweise in eine Röhre gesetzt, durch die getrocknete Luft geleitet wurde. Der in der Atemluft enthaltene Wasserdampf wurde in einer Kühlfalle kondensiert und die spezifische Aktivität des Kondensats direkt im Flüssigkeitszintillationszähler (Tri-Carb, Fa. Packard) gemessen. Als Szintillationsflüssigkeit wurde eine Dioxan-Lösung (2,5-Diphenyloxazol 5 g, Naphthalin 100 g, Dioxan ad 1 l) benutzt. Die Zählzählbeute wurde mit einem internen Standard bestimmt.

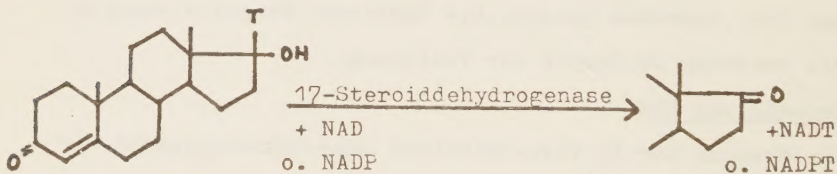
Vorbehandlung

Die mit Phenobarbital vorbehandelten Tiere erhielten in

Anlehnung an Conney & Klutch (35) zwei Tage lang zweimal täglich 40 mg/kg. Das Phenobarbital wurde als freie Säure in äthanolischer Lösung i.p. injiziert. Die Vergleichstiere erhielten über den gleichen Zeitraum die entsprechenden Mengen des Lösungsmittels.

Den mit Tetrachlorkohlenstoff vorbehandelten Tieren wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen je eine einmalige Dosis von 3 ml/kg s.c. injiziert. Den Tieren wurde z.T. am dritten, z.T. am sechsten Tag nach Versuchsbeginn das radioaktiv markierte Steroid appliziert. Pro Tier wurden jeweils 15 - 20 μ Ci i.m. in 0,1 ml Propylenglykol gelöst injiziert.

Das Auftreten von Tritium im Atemwasser nach Injektion von 17α -T-markiertem Östradiol oder Testosteron wird entsprechend dem folgenden Schema erklärt (1):



→ Atmungskette → HTO

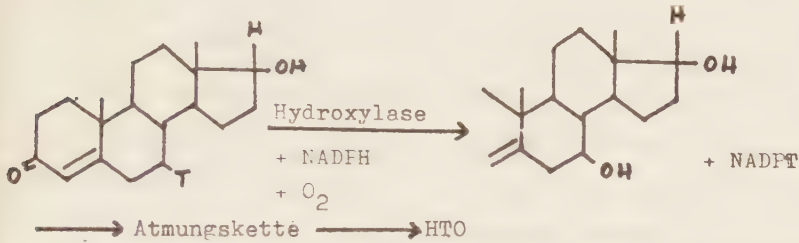
Die Mindestoxidation bzw. -hydroxylierung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\mu\text{Ci/ml Atemwasserdestillat} \cdot 100}{\mu\text{Ci/ml Körperwasser injiziert}} = \% \text{ Mindestoxidation}$$

Hierbei wurde das Körperwasser mit 66% des Körpergewichtes angenommen (2).

Da das entstandene NADT bzw. NADPT möglicherweise auch zum geringen Teil für Synthesen verbraucht und nicht quantitativ zu HTO verbrannt wird, stellt das im Atemwasser auftretende HTO nur ein Mindestmaß der Oxidation an C-17 dar.

Nach Injektion von 7-T-Testosteron oder 6,7-T-Oestradiol läßt sich das Auftreten von HTO im Atemwasser folgendermaßen erklären:



Dabei kann in beiden Fällen vorausgesetzt werden, daß sich das in der Leberzelle entstandene HTO in relativ kurzer Zeit mit dem Körperwasser vermischt und dementsprechend im Atemwasser auftritt. Hier ist das im Atemwasser auftretende HTO sogar ein absolutes Maß für die Hydroxylierung. Die Tritiummarkierung an C-17 stellt eine "stoffwechsel-labile" Markierung dar; d.h. der normale Stoffwechsel führt zu einer Abspaltung des Tritiums und somit zum Verlust der Radioaktivität des Moleküls.

Demgegenüber ist die Markierung an C-6 bzw. C-7 wegen fehlender bzw. äußerst geringfügiger Hydroxylierung an diesen Kohlenstoffatomen im normalen Tier "stoffwechsel-stabil". Dies drückt sich dadurch aus, daß bei nicht vorbehandelten Tieren nach Applikation derartig markierter Steroide nur ein sehr geringer Gehalt an HTO im Atemwasser auftritt (1,24).

In vitro-Versuche

Zur Gewinnung von Schnitten, Homogenat und Zellfraktionen wurde den Tieren nach Tötung durch Chloroforminhalation die Leber entnommen und unter Eiskühlung weiterverarbeitet. Für einen Teil der Inkubationen wurden Schnitte von ca.

100 mg Gewicht angefertigt.

Zur Gewinnung von Homogenat und Zellfraktionen wurde jeweils die Leber eines Tieres unter Zugabe der gleichen Gewichtsmenge 0,25 molarer Saccharoselösung homogenisiert. Zur Gewinnung von Mikrosomen und Cytoplasma wurde das Homogenat 15 min. bei 15 000 g vorzentrifugiert und der Überstand 60 min. bei 110 000 g zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand entspricht dem Cytoplasma, der Niederschlag der Mikrosomenfraktion. Die Mikrosomenfraktion wurde anschließend einmal in TRIS-HCl-Puffer (pH 7,4) gewaschen.

Versuchsansätze

Die Inkubationsansätze enthielten Schnitte, Homogenat oder Mikrosomen entsprechend 100 mg Leber, 4 ml Ringerphosphatpuffer (pH 7,4) und die in 0,1 - 0,2 ml Äthanol gelösten radioaktiven bzw. inaktiven Steroide, die als Wasserstoffakzeptorenb dienten. Zu den Mikrosomen enthaltenden Inkubationsansätzen wurden zusätzlich 100 Mol/l NAD bzw. NADP zugegeben. (Die Konzentrationen in den einzelnen Inkubationsansätzen sind aus den Legenden zu den Abb. 1, 2, 3 und den Tab. 2 und 3 ersichtlich). Es wurde 10 und 30 min. inkubiert. Die Inkubation erfolgte in geschlossenen Plastikfläschchen bei 37° C im Schüttelthermostaten und wurde durch Einbringen der Fläschchen in Eiswasser beendet. Anschließend wurde der Inkubationsansatz zur Isolierung freier Metaboliten zweimal mit je 4 ml Chloroform extrahiert.

Aus dem wässrigen Überstand wurde durch Gefrierdestillation der jeweilige Gehalt an HTO bestimmt. Die gesammelten Chloroformauszüge wurden zur Trockene eingeengt und dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel HF-Platten (Fa. Merck) aufgetrennt.

Die Chromatogramme wurden aufsteigend in den Systemen Chloroform/Aceton 9:1 und Cyclohexan/Essigester 1:1 entwickelt. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte durch Vergleich mit mitlaufenden authentischen Referenzsubstanzen, sowie durch Acetylierung und Rechromatographie der Acetate. (Tabelle der R_F -Werte siehe Tab.4).

Die Radioaktivität der Dünnschichtchromatogramme wurde direkt auf der unveränderten Platte mit dem "Dünnschicht-scanner" (Modell LB 2722, Fa. Berthold) gemessen.

Bestimmung der C-17-Oxidation im optischen Test

Für die Messung der Oxidationsraten von Testosteron und Östradiol im optischen Test wurden Mikrosomen und Cytoplasma benutzt. Der Test wurde am Eppendorf-Photometer mit geheiztem Küvettenhalter (37°C) bei 366 nm durchgeführt. Es wurden 4 cm Quarzküvetten verwendet. Der Küvetteninhalt bestand jeweils aus 10 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 7,4), den in 0,1 - 0,2 ml Athanol gelösten Steroiden und der entsprechenden Coenzymmenge, die in TRIS-HCl-Puffer gelöst war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mikrosomen bzw. Cytoplasma, jeweils 50 mg Leber entsprechend, gestartet.

2. Ergebnisse

2.1. Versuche nach CCl_4 -Vorbehandlung

2.1.1. In vivo-Versuche zur Oxidation an C-17

Zur Klärung der Frage, ob eine Schädigung der Leber durch CCl_4 eine in vivo nachweisbare Auswirkung auf Teile des Steroidstoffwechsels hat, wurde die in vivo-Oxidation von $17\alpha\text{-T-Testosteron}$ und $17\alpha\text{-T-Östradiol}$ untersucht (Abb.6). Diese Versuche zur in vivo-Oxidation nach CCl_4 -Schädigung ließen keinerlei Veränderung der normalen Oxidationsrate erkennen. Selbst bei Tieren beiderlei Geschlechts, die mit 35 ml CCl_4/kg (in vier Einzeldosen appliziert) vorbehandelt waren, zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des HTO-Gehaltes des Atemwassers gegenüber Kontrolltieren, bei denen nach fünf Stunden ca. 40% der applizierten Gesamtaktivität an 17-Hydroxysteroiden als HTO in der Ausatemungsluft erscheinen (Abb.6)

Der hier erhobene Befund, daß unter CCl_4 -Vorbehandlung in vivo keine Verringerung der Östradioloxidation an C-17 eintritt, steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Wenzel et al.(3), die eine starke Verringerung der Östradioloxidation nach Vorbehandlung mit 4,3 ml CCl_4/kg beschrieben. Zur Klärung dieses Widerspruchs wurden entsprechende Oxidationsversuche in vitro mit Rattenleberschnitten, Homogenat und Mikrosomen durchgeführt (Abb.1,2,3).

2.1.2. Inkubationsversuche zur Oxidation an C-17

Hierbei zeigte sich, daß die in vivo nicht nachweisbare Schädigung in vitro nachweisbar ist.

In der Mikrosomenfraktion (Abb.3) sanken die Oxidationsraten von Östradiol und Testosteron auf 70% bzw. 75% des Normalwertes. Im Homogenat (Abb.2) waren für Östradiol

keine wesentlichen Veränderungen der Umsatzrate unter der Schädigung zu erkennen. Für Testosteron blieb der Umsatz zwar konstant, der Anteil des 3-17-Androstendions an den isolierten Metaboliten verringerte sich jedoch zugunsten der Androstandiole und nicht näher identifizierter Metaboliten. Bei Inkubationen mit Schnitten (Abb.1) waren weder für Östradiol noch für Testosteron wesentliche Veränderungen des Umsatzes durch die Schädigung zu erkennen. Bei der Reduktion von 3-17-Androstendion war eine Verringerung des Umsatzes sowohl im Homogenat (Abb.2) als auch in der Mikrosomenfraktion zu erkennen (Abb.3). Hierbei gingen die Umsatzraten auf 60% bzw. 50% der Kontrollwerte zurück. Auch hier erhöhte sich, wie bei den Inkubationen von Testosteron mit Homogenat aus CCl_4 -geschädigter Leber, der Anteil der Androstandiole und nicht identifizierter Metaboliten an der Ausbeute.

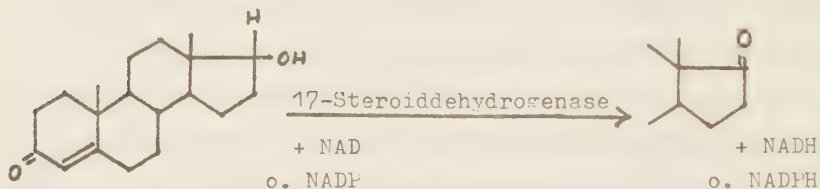
Bei allen Inkubationen von 3-17-Androstendion bzw. Testosteron mit aus geschädigter Leber stammenden Mikrosomen konnten keine Androstandiole oder nicht identifizierte, niedriger polare Metaboliten isoliert werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die CCl_4 -Vorbehandlung in aus männlichen Ratten stammender Leber einerseits zu einer verminderten Oxidation bzw. Reduktion an C-17 in vitro führt, wobei der Stoffwechsel von Testosteron stärker betroffen ist als der von Östradiol und andererseits zu einer verstärkten Bildung von Testosteronderivaten führt, die normalerweise nur in geringem Umfang auftreten.

3.1.3. Versuche zur Oxidation an C-17 in Zellfraktionen

Um differenziertere Aussagen über das Ausmaß und die

Lokalisation der CCl_4 -Schädigung zu ermöglichen wurde die Oxidation von Östradiol und Testosteron im optischen Test im Cytoplasma und in der Mikrosomenfraktion getrennt untersucht (Tab.1). Als Maß für die Oxidation wurde bei verschiedenen Coenzymkonzentrationen die Menge des entstandenen reduzierten Coenzym pro Minute gemessen.



In der geschädigten Mikrosomenfraktion verringerte sich die Oxidation von Östradiol bei verschiedenen NAD-Konzentrationen etwa um den Faktor 7 gegenüber den Kontrollwerten, während bei Zugabe von NADP als Coenzym der Umsatz nur auf etwa ein Viertel des Normalwertes sank.

Die Oxidation von Testosteron ging bei allen Versuchsansätzen unter der Schädigung auf etwa ein Drittel ihres Kontrollwertes zurück.

Im Cytoplasma verringerte sich die Oxidation von Östradiol bzw. Testosteron bei Versuchsansätzen ohne Zugabe von Coenzym um den Faktor 7 bzw. 4.

Bei Zugabe von Coenzym waren jedoch die Oxidationsraten im geschädigten Cytoplasma deutlich höher als in Kontrollen unter der gleichen Coenzymkonzentration. Sowohl für Östradiol als auch für Testosteron erhöhte sich der Umsatz etwa um den Faktor 2 gegenüber den Kontrollwerten.

Dieser letztgenannte Befund ist möglicherweise auf die durch die CCl_4 -Vorbehandlung auftretende Fragmentierung

des endoplasmatischen Retikulums (25) und das damit verbundene Übertreten mikrosomaler Enzyme in das Cytoplasma zurückzuführen.

3.1.4. Inkubationsversuche zur Wasserstoffübertragung

Als weitere durch die CCl_4 -Schädigung eventuell zu beeinflussende Reaktion wurde die von Wenzel & Follow (5) beschriebene Wasserstoffübertragung vom C-17 des Östradiols auf 3-17-Androstendion in aus männlichen Ratten stammender Leber untersucht. Hierbei dient 3-17-Androstendion als Akzeptor für bei der Oxidation von Östradiol entstehenden Wasserstoff bzw. Tritium. Die Reduktion kann am Molekül des 3-17-Androstendions u.a. in C-17-, C-4- oder C-5-Stellung erfolgen (Abb. 1, 2, 3).

Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß die Wasserstoffübertragung von Östradiol auf 3-17-Androstendion in Schnitten und Homogenat vollkommen unterbunden wurde, da weder Testosteron noch andere Reduktionsprodukte des 3-17-Androstendions isoliert werden konnten.

Demgegenüber veränderte sich die Ausbeute an tritiiertem Wasser aus den geschädigten Geweben nicht wesentlich gegenüber den Kontrollen.

Dies spricht für das Vorhandensein von zwei Enzymsystemen, die unabhängig voneinander und in unterschiedlicher Weise durch die CCl_4 -Vorbehandlung beeinflussbar, den bei der C-17-Oxidation anfallenden Wasserstoff an die Atmungskette abgeben oder auf andere Steroide übertragen.

In der Mikrosomenfraktion (Abb. 3) verringerte sich der Tritiumeinbau an das C-17 des 3-17-Androstendions nur um etwa die Hälfte, während die Bildung von Androstendiolen unter der Schädigung auch hier vollkommen sistierte.

Die geringe Bildung von tritiiertem Wasser dürfte hierbei auf die Verunreinigung der Mikrosomenfraktion durch Mitochondrien zurückzuführen sein.

Ferner wurde die umgekehrte Reaktion, d.h. die Reduktion von Östron zu Östradiol durch vom C-17 des Testosterons stammenden Wasserstoff in aus männlichen Ratten stammender Leber untersucht.

Die Voraussetzung, daß das bei diesem Versuch isolierte Östradiol tatsächlich durch Reduktion des Östrons entstanden ist und nicht durch Aromatisierung des A-Ringes des Testosteron wird dadurch bestätigt, daß die Inkubation von ^{14}C -markiertem Testosteron mit aus männlichen Ratten stammender Leber kein Östradiol liefert.

Bei der Tritiumübertragung von $17\alpha\text{-T-Testosteron}$ auf Östron blieben in Schnitten und Homogenat praktisch alle Werte unverändert gegenüber den Kontrollen, während in der geschädigten Mikrosomenfraktion die Östradiolausbeute um etwa ein Drittel sank und die Bildung von Androstandiolen und nicht identifizierten Metaboliten sistierte.

3.1.5. In vivo-Versuche zur Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7

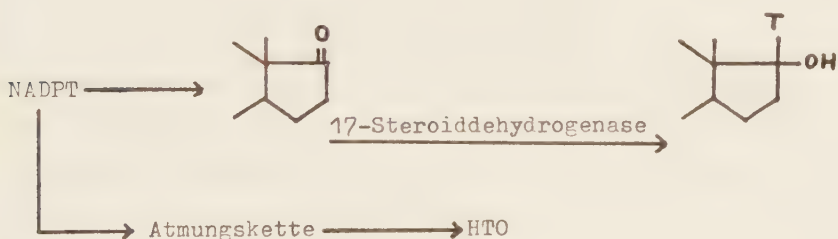
Im normalen Stoffwechsel wird nur ein geringer Teil von Östradiol und Testosteron durch Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7 inaktiviert. Daher erscheinen nach Injektion von 6,7-T-Östradiol oder 7-T-Testosteron nur sehr geringe Tritiumaktivitäten (2 - 4% der injizierten Aktivität) im Atemwasser der Tiere (1,24), da das Tritium relativ "stoffwechsel-stabil" im Molekül gebunden ist. Zur Beantwortung der Frage, ob dieser Abbauweg durch die Vorbehandlung mit CCl_4 beeinträchtigt wird, wurde entsprechend vorbehandelten Tieren 6,7-T-Östradiol bzw. 7-T-Testosteron appliziert. Es traten jedoch nach CCl_4 -Vorbehandlung keine Veränderun-

gen der Tritiumaktivitäten im Atemwasser gegenüber den Kontrollen auf. Somit war auch hier kein Effekt der CCl_4 -Vorbehandlung in vivo zu erkennen.

3.1.6. Inkubationsversuche zur Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7

In der Erwartung, daß entsprechend den Ergebnissen der Versuche zur C-17-Oxidation eine in vivo nicht nachweisbare Schädigung des C-6 bzw. C-7-Stoffwechsels in vitro nachweisbar ist, wurden entsprechende Inkubationen durchgeführt (Tab. 2, 3).

Die diesen Versuchen zugrundeliegenden Stoffwechselschritte sind die Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7 und die damit möglicherweise verbundene Tritiumübertragung auf ein zu reduzierendes Steroidmolekül oder die Atmungskette. Das bei der Hydroxylierung entstandene NADPT kann das Tritium also entweder an die Atmungskette abgeben oder es z.B. zur Reduktion eines 17-Ketosteroids abgeben.



Die Inkubationen mit 6,7-T-Östradiol und 7-T-Testosteron wurden mit aus männlichen und weiblichen Ratten stammendem Leberhomogenat 10 min. inkubiert. Wegen der höheren spezifischen Aktivität der benutzten Steroide betrugen die Konzentrationen in diesen Inkubationsansätzen nur etwa ein Fünftel der Konzentrationen in den entsprechenden Ansätzen mit 17-T-markierten Steroiden. Darauf sind die

z.T. erheblich höheren prozentualen Umsatzraten dieser Inkubationen wahrscheinlich zurückzuführen.

Es konnte weder bei unvorbehandelten noch bei CCl_4 -vorbehandelten männlichen und weiblichen Ratten eine Wasserstoffübertragung von C-6 bzw. C-7 des Östradiol oder Testosteron auf 3-17-Androstendion oder Östron gefunden werden. Dies zeigte sich darin, daß keinerlei Reduktionsprodukte des 3-17-Androstendion oder des Östron isoliert werden konnten.

Auch die Bildung von tritiiertem Wasser, die in diesem Fall ein Maß für die Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7 ist, blieb gegenüber den Kontrollen unverändert.

Als Nebenbefund konnte aus dem aus weiblichen Ratten stammendem Leberhomogenat bei Inkubationen mit 7-T-Testosteron in erheblichen Mengen ein Metabolit isoliert werden, der sich in aus männlichen Ratten stammendem Leberhomogenat nicht bildete. Nach den Ergebnissen von Rechromatographie und Acetylierung handelt es sich wahrscheinlich um 5 -Androstendion (Tab.4). Die Ausbeute dieses Metaboliten sank in CCl_4 -vorbehandelter Leber auf etwa die Hälfte des Kontrollwertes.

Bei den Inkubationen von mit aus männlichen Ratten stammendem Leberhomogenat (Tab.2) mit 6,7-T-Östradiol und 7-T-Testosteron glichen alle anderen Ergebnisse denjenigen, die aus Inkubationen mit 17-T- und ^{14}C -markierten Steroiden gewonnen wurden.

In aus weiblichen Ratten stammendem Leberhomogenat (Tab.3) wurde jedoch im Gegensatz zu dem aus männlichen Tieren stammendem Homogenat keine Verringerung der Östradioloxidation durch die CCl_4 -Vorbehandlung gefunden. Auch die verstärkte Bildung von Androstandiolen aus Testosteron nach CCl_4 -Vorbehandlung stellte sich bei weiblichen

Tieren nicht ein. Der Anteil der Androstendiole an der Gesamtausbeute war in diesem Fall eher vermindert.

3.2. Versuche nach Phenobarbital-Vorbehandlung

3.2.1. In vivo-Versuche zur Oxidation an C-17

Seit längerem ist bekannt, daß durch Gabe von Phenobarbital gewisse arzneimittelabbauende Enzymsysteme induziert werden (32).

Zur Beantwortung der Frage, ob sich diese Enzyminduktion auch auf den C-17-Stoffwechsel erstreckt, wurde die in vivo-Oxidation von 17α -T-Östradiol und 17α -T-Testosteron nach Vorbehandlung mit Phenobarbital untersucht (Abb. 6).

Hierbei wurde bei beiden Geschlechtern keine Veränderungen der normalen Oxidationsraten gefunden. Weder am 3. noch am 6. Tag nach Beginn der Vorbehandlung zeigten sich Abweichungen von den Kontrollwerten. Hier ist allerdings die Frage aufzuwerfen, ob eine erhöhte Oxidationsrate mit der gewählten Methodik nachweisbar wäre. Es ist denkbar, daß das Auftreten von HTO im Atemwasser bei dieser Methodik nicht durch die Aktivität der 17-Hydroxysteroiddehydrogenase limitiert wird, sondern durch die Diffusion des HTO in das Körperwasser. Diese Fehlerquelle kann ausgeschlossen werden, da injiziertes HTO erheblich schneller im Atemwasser auftritt, als HTO, das durch Steroidoxidation entstanden ist (49).

3.2.2. Inkubationsversuche zur Oxidation an C-17

In der Annahme, daß auch nach Vorbehandlung mit Phenobarbital eine in vivo nicht nachweisbare Veränderung des Umsatzes in vitro nachweisbar ist, wurden die entsprechen-

den Inkubationsversuche durchgeführt. In diesen Versuchen wurden 6,7-T-Östradiol und 7-T-Testosteron als radioaktiv markierte Steroide verwendet. Die Inkubationen wurden mit aus männlichen und weiblichen Tieren stammendem Leberhomogenat am 3. Tag nach Beginn der Vorbehandlung mit Phenobarbital, d.h. 16 Stunden nach der letzten Injektion durchgeführt. Im aus männlichen Tieren stammenden Homogenat war die Oxidation von Östradiol und Testosteron an C-17 deutlich verringert. Die Oxidationsraten sanken hier auf 80% bzw. 60% der Kontrollwerte. Bei weiblichen Tieren wurde dagegen außer einer geringfügigen Verringerung der Testosteronoxidation keine Veränderungen dieser Art gefunden (Tab. 2, 3).

3.2.3. Inkubationsversuche zur Wasserstoffübertragung

Es konnte bei diesen Inkubationen weder bei den Kontrollen noch bei den mit Phenobarbital vorbehandelten Tieren eine Wasserstoffübertragung vom C-6 bzw. C-7 des 6,7-T-Östradiols bzw. 7-T-Testosterons auf 3-17-Androstendion oder Östron, die hier als Akzeptoren für das bei der Hydroxylierung freiwerdende Tritium dienen sollten, gefunden werden (Tab. 2, 3). (Zur Erläuterung dieser Versuche siehe auch Abb. S. 15).

3.2.4. In vivo-Versuche zur Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7

Die parallel zu den Inkubationsversuchen (3.2.5.) am 3. Tag der Vorbehandlung durchgeführten in vivo-Versuche zur Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7 ergaben in Übereinstimmung mit den in vitro-Versuchen keine Steigerung der Hydroxylierungsrate. Es wurde nur eine den Kontrollen entsprechende geringfügige HTO-Ausscheidung im Atemwasser gefunden. Da die Möglichkeit besteht, daß einer-

seits die Zeit zur Enzyminduktion nicht ausreicht oder andererseits das hydroxylierende Enzymsystem noch durch nicht ausgeschiedenes Barbiturat blockiert ist (siehe Diskussion), wurden die in vivo-Versuche am 6. Tag nach Beginn der Vorbehandlung wiederholt (Abb.4,5).

Hierbei trat ein gegenüber den Kontrollen stark erhöhter Anstieg der Tritiumkonzentration im Atemwasser auf. So erschienen 5 Stunden nach Injektion von 6,7-f-Östradiol bei männlichen Ratten (Abb.4) ca. 8% der injizierten Tritiumaktivität als HTO im Atemwasser, was etwa dem 4-fachen des Kontrollwertes entspricht.

Bei weiblichen Tieren (Abb.4) betrug die Erhöhung der Tritiumaktivität im Atemwasser nach Applikation von 6,7-T-Östradiol sogar das 5-fache der Kontrollen.

Der gleiche Effekt stellte sich in geringerem Ausmaß auch nach Applikation von 7-T-Testosteron bei beiden Geschlechtern ein (Abb.5). Hierbei erschienen nach 5 Stunden bei männlichen Versuchstieren ca. 8% und bei weiblichen Tieren ca. 15% der injizierten Tritiumaktivität im Atemwasser (Abb.5).

3.2.5. Inkubationsversuche zur Hydroxylierung an C-6 bzw. C-7

Das bei Inkubationen mit an C-6 oder C-7 tritiierten Steroiden entstehende HTO ist ein direktes Maß für die Hydroxylierung an diesen C-Atomen. Bei den am 3. Tag nach Beginn der Phenobarbital-Vorbehandlung vorgenommenen in vitro-Versuchen entsprach die Ausbeute an HTO den Kontrollen, d.h. am 3. Tag nach Beginn der Vorbehandlung war in vitro keine Steigerung der Hydroxylierungsrate nachweisbar.

4. Diskussion

Der Einfluß der CCl_4 -Schädigung auf die C-17-Oxidation von Östradiol und Testosteron

Aus älteren Arbeiten (15,16,21) ist bekannt, daß nach akuter toxischer Leberschädigung durch CCl_4 oder Äthanol in vivo eine verstärkte Wirksamkeit von endogenem und exogenem Östrogen zu beobachten ist. Als zugrundeliegender Mechanismus wurden einerseits eine verringerte Oxidation an C-17 (3) und andererseits eine verringerte Glucuronidierung diskutiert (11,20,45). Die im Folgenden diskutierten Versuche wurden durchgeführt, um Aufschluß über Art und Umfang der durch die Vorbehandlung mit CCl_4 hervorgerufenen Veränderungen im Abbau von Östradiol und Testosteron zu gewinnen.

In der Beeinflussbarkeit der Oxidation an C-17 von Östradiol und Testosteron durch CCl_4 bestehen starke Geschlechtsunterschiede. Zwar war in vivo bei beiden Geschlechtern keine Beeinflussbarkeit der Oxidation an C-17 zu erkennen, aber während aus weiblichen Ratten stammende Leber auch in vitro kaum einen Effekt der Vorbehandlung mit CCl_4 zeigte, fanden sich in aus männlichen Tieren stammender Leber erhebliche Veränderungen der Oxidation am C-17 dieser Steroide.

Hierbei ergab sich u.a. folgender Widerspruch: Weibliche Tiere oxidieren Östradiol erheblich langsamer zu Östron als männliche, was in Übereinstimmung mit Arbeiten von Kato & Gillette (43) sowie Inscoe & Axelrod (44) steht, die bei zahlreichen mikrosomalen Enzymen eine stärkere Aktivität bei männlichen als bei weiblichen Tieren fanden. Erwartungsgemäß müßte bei dieser relativ geringen Enzymkapazität die CCl_4 -Schädigung einen starken Effekt haben. Dies ist jedoch nicht der Fall (Tab.3).

Der Befund, daß die Verringerung der Oxidation an C-17 nach Vorbehandlung mit CCl_4 nur in vitro und nicht in vivo sichtbar wird, läßt sich durch die große Kapazität der 17β -Steroiddehydrogenase in der Rattenleber erklären (22). Demnach sind männliche Ratten in der Lage mindestens 3,4 mg Östradiol/kg in 5 Stunden zu oxidieren. Die in der vorliegenden Arbeit injizierte Menge betrug aber nur knapp 0,1 mg/kg, d.h. damit eine eventuelle Schädigung in vivo sichtbar wird, müßte der Umsatz um mehr als das 30-fache zurückgehen. Der Umsatz ging in der Mikrosomenfraktion, allerdings unter Zusatz von Coenzym, jedoch nur um den Faktor 7 zurück. Aber selbst unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Verringerungen der Coenzymkonzentration (10), bzw. Verkleinerungen des Quotienten "oxidiertes Pyridin-nucleotid/reduziertes Pyridinnucleotid" (17) eine weitere Verringerung des Umsatzes bewirken können, erscheint es unwahrscheinlich, daß die Schädigung bei der vorhandenen Kapazität der 17β -Steroiddehydrogenase zu einer in vivo nachweisbaren Verringerung der Östradioloxidation an C-17 führen kann.

Somit ist die beschriebene Verringerung der biologischen Inaktivierung von Östradiol nach toxischen Leberschäden wahrscheinlich auf die Störung der Ausscheidung infolge verminderter Konjugation zurückzuführen. Diese Vermutung wird durch die Arbeiten von Beck et al. (11), Nilius & Rath (20) und Isselbacher (45) gestützt, die unter der akuten toxischen Leberschädigung erhebliche Verringerungen der Glucuronidierung bzw. eine verringerte Aktivität der β -Glucuronidase fanden.

Aus in vivo-Versuchen ist bekannt (21), daß die Inakti-

vierung von Testosteron durch akute toxische Leberschädigung wesentlich geringer beeinträchtigt wird als die Inaktivierung von Östradiol (4,15,16,21).

Diese Befunde konnten durch die Ergebnisse des optischen Tests (Tab.1) und der 10 minütigen Inkubationen mit Homogenat (Tab.2,3) bestätigt werden; sowie dadurch, daß auch nach Vergiftung mit CCl_4 noch eine Wasserstoffübertragung vom C-17 des Testosterons auf Östron möglich ist, während der Wasserstofftransport vom C-17 des Östradiols auf 3-17-Androstendion vollständig sistierte.

Diese unterschiedliche Schädigung verschiedener Funktionen der Leberzelle, die auch beim Abbau exogener Stoffe beobachtet wurde (14), ließe sich folgendermaßen erklären:

Aus den Ergebnissen des optischen Tests läßt sich schließen, daß die Testosteronoxidation zu einem fast doppelt so großen Anteil wie die Östradioloxidation im Cytoplasma der Leberzelle lokalisiert ist. Auf Grund dieses Befundes und der (weiter unten diskutierten) Veränderung der Bildung von Androsterinderivaten scheint die Annahme berechtigt, daß der Testosteronabbau deswegen weitgehend von der Schädigung verschont bleibt, weil die entsprechenden Enzymsysteme zu einem relativ großen Anteil im Cytoplasma lokalisiert sind und cytoplasmatische Enzyme anscheinend von der Schädigung nicht betroffen sind.

Der Einfluß der CCl_4 -Schädigung auf die Wasserstoffübertragung

Bezüglich des Wasserstofftransportes vom C-17 des Testosterons bzw. Östradiols auf Östron bzw. 3-17-Androstendion zeigte sich, daß in der Mikrosomenfraktion der Wasserstofftransport unter der Schädigung im gleichen

Maß zurückging wie die Oxidation des entsprechenden Wasserstoffdonators. Das völlige Sistieren der Wasserstoffübertragung von Östradiol auf 3-17-Androstendion in CCl_4 -geschädigten Schnitten und Homogenat dürfte auf den Summationseffekt von mikrosomaler Schädigung und intracellulären Coenzymverlusten bzw. Verschiebungen (17) des Quotienten "oxidiertes Pyridinnucleotid/reduziertes Pyridinnucleotid" zurückzuführen sein.

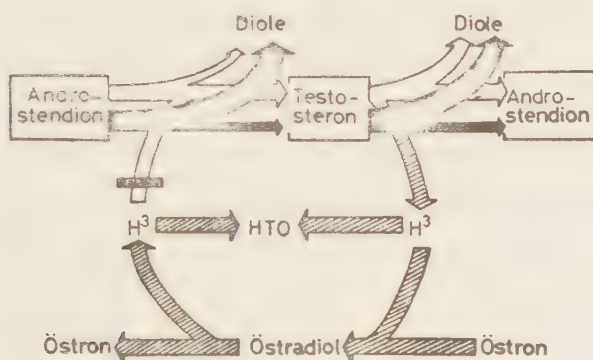


Abb.7

Schema der Veränderungen des Testosteron - und Östradiolstoffwechsels in der Rattenleber nach Vorbehandlung mit CCl_4 . Weiß: normaler Stoffwechsel; schraffiert: durch die Vorbehandlung geringfügig oder nicht beeinflusste Stoffwechselschritte; schwarz: Veränderungen des Stoffwechsels durch die Vorbehandlung.

In aus der Leber CCl_4 -vorbehandelter männlicher Tiere stammenden Schnitten und Homogenat waren einige Metaboliten des Testosterons in charakteristischer Weise vermehrt. 5α -Androstendiol-(3β - 17β) und 5β -Androstendiol-(3α - 17β) traten in Mengen auf, die ein Mehrfaches der

der Kontrollwerte ausmachten, d.h. die Reduktion der Δ_4 -Doppelbindung an der 3-Ketogruppe fanden in verstärktem Ausmaß statt. Es ist naheliegend anzunehmen, daß in diesem Fall die Androstandiole (und die gleichzeitig vermehrten Androstan-ol-ene) bei verminderter Oxidation des Testosterons an C-17 direkt aus Testosteron entstanden sind; z.B. über Androstan-5on-17 β ol (23). Dagegen spricht jedoch, daß die gleichen Metaboliten auch vermehrt aus 4- 14 C-Androstendion gebildet werden. Es bleibt also offen, ob die verstärkte Bildung von Androstanderivaten als Ausweichreaktion zur biologischen Inaktivierung des Testosterons bei verringerter Oxidation an C-17 aufzufassen ist, oder ob sie durch die oben zit. (17) Verschiebungen der Coenzymkonzentrationen bedingt ist.

Aus aus nicht vorbehandelten weiblichen Tieren stammendem Leberhomogenat konnten nach 10 minütiger Inkubation nur etwa halb so viel Androstanderivate isoliert werden wie aus dem Leberhomogenat männlicher Kontrolltiere. Zudem war hier der Anteil der 5 α 3 α -konfigurierten Metaboliten erheblich höher als in aus männlichen Tieren stammendem Homogenat (5) und der Anteil der Androstanderivate an der Gesamtausbeute ging im Gegensatz zu männlichen Kontrolltieren unter der Vorbehandlung mit COCl_4 zurück.

Dieser Befund läßt sich in Anknüpfung an das zur Östradioloxidation Gesagte interpretieren: In der Leber weiblicher Ratten ist hauptsächlich die 4en(5 α)-Steroidreduktase und kaum die 4en(5 β)-Reduktase vertreten (46, 44); ähnlich verhält es sich bei der 6-Hydroxysteroiddehydrogenase; auch hier ist hauptsächlich das den Wasserstoff in α -Stellung einbauende Enzym in weiblicher

Rattenleber vertreten (46), während die 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase praktisch nur in der Leber männlicher Ratten vorkommt (31,34).

Die beiden in α -Stellung reduzierenden Enzyme sind ganz oder überwiegend (18,26,33,46) an das endoplasmatische Retikulum gebunden und werden daher ebenso wie die 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase von der Schädigung dieser Struktur durch CCl_4 betroffen, während die bei männlichen Ratten hauptsächlich vertretene $5\alpha\beta$ -Reduktase (47) und die 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase zum überwiegenden Teil im Cytoplasma lokalisiert sind und offensichtlich an der Schädigung der mikrosomalen Enzymsysteme nicht teilhaben.

Der Einfluß der Vorbehandlung mit Phenobarbital auf den oxidativen Abbau von Östradiol und Testosteron

Die Möglichkeit der Induktion des arzneimittellebbauenden Enzymsystems der Leber, das u.a. auch Steroide oxidativ abbaut, ist seit längerem bekannt. Bisher wurde hauptsächlich die Induktion hydroxylierender Abbauprozesse in vitro untersucht. Die im Folgenden diskutierten Versuche sollten u.a. klären, ob auch die Oxidation an C-17 induzierbar ist, da dieser Reaktion bei der biologischen Inaktivierung von Östradiol und Testosteron große Bedeutung zukommt.

Im Homogenat, das aus der Leber männlicher Ratten nach Phenobarbitalvorbehandlung gewonnen wurde, war die Oxidation an C-17 bei Östradiol und Testosteron verringert. Dies ist möglicherweise durch die von Tephly et al. (28, 37) beschriebene kompetitive Hemmung mikrosomaler Enzyme durch verschiedene Substrate arzneimittellebbauender En-

zyme zu erklären, da im Inkubationsansatz bei einer Steroidkonzentration von ca. $2,5 \mu\text{Mol/L}$ eine Phenobarbitalkonzentration von ca. $3,8 \mu\text{Mol/L}$ bestand. Offen bleibt jedoch, warum diese Hemmung in aus weiblichen Ratten stammendem Leberhomogenat nicht zu beobachten war, obwohl hier die Phenobarbitalkonzentration aufgrund der geringeren Ausscheidungsrate weiblicher Ratten (9) mindestens ca. $5,7 \mu\text{Mol/L}$ betrug.

Bei den in vitro-Versuchen zur Induktion der Steroidhydroxylierung durch Phenobarbital war keine meßbare Steigerung der Hydroxylierung festzustellen. Als Gründe hierfür kämen in Betracht, daß der zur Verfügung stehende Zeitraum zur Enzyminduktion nicht ausreichte, und/oder, daß zum Zeitpunkt der Inkubationen noch eine zu hohe, die Hydroxylierung hemmende (28,37), Phenobarbitalkonzentration bestand. Hierbei kommt möglicherweise dem zweiten Punkt die größere Bedeutung zu, da Conney et al. (48) fanden, daß die Enzyminduktion durch Phenobarbital schon am 3. Tag nach Applikation des Induktors ihr Maximum erreicht. In Übereinstimmung mit Conney (39) wurde bei den in vivo-Versuchen eine weitaus stärkere Enzyminduktion bei weiblichen, als bei männlichen Tieren gefunden. Der Grund dafür ist jedoch unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, daß Phenobarbital bei weiblichen Ratten wegen der vergleichsweise geringen Aktivität mikrosomaler Enzyme dieser Tiere (36) eine verlängerte Wirkung entfaltet und somit zu einer verstärkten Enzyminduktion führt.

Unter Zugrundelegung einer mittleren Eliminationsrate von 63%/24 Stunden bei weiblichen und von 77%/24 Stunden bei männlichen Ratten (9) bestand zum Zeitpunkt der Steroidinjektion am 3. Tag im Körper der Versuchs-

tiere eine Phenobarbitalkonzentration von durchschnittlich ca. 53 mg/kg bei weiblichen und ca. 34 mg/kg bei männlichen Ratten. Hierbei ist die unterschiedliche Verteilung des Phenobarbitals im Körper nicht berücksichtigt. Es ist jedoch zu erwarten, daß bei weiblichen Ratten auch in der Leber die Phenobarbitalkonzentration unter den gegebenen Bedingungen wesentlich höher ist als bei männlichen Tieren.

Der Befund, daß nach Applikation von 6,7-T-Östradiol eine etwa um den Faktor 1,5 höhere Tritiumaktivität als nach Injektion von 7-T-Testosteron im Atemwasser auftritt, ist auf die Doppeltmarkierung des Östradiols zurückzuführen. Offensichtlich findet eine Hydroxylierung nicht nur an C-7 statt, sondern auch, wenn auch in geringerem Ausmaß an C-6 (35).

Die bisher festgestellten Ähnlichkeiten zwischen dem arzneimittelabbauenden und dem steroidhydroxylierenden Enzymsystem des endoplasmatischen Retikulums haben zu der Hypothese geführt, daß beide Enzymsysteme im wesentlichen identisch seien (36,52,53).

Der Befund, daß die Vorbehandlung mit Phenobarbital nicht zu einer Induktion der Oxidation an C-17 in vivo führt, deutet daraufhin, daß das die 17β -Steroiddehydrogenase enthaltende Enzymsystem vollständig von dem hydroxylierenden bzw. arzneimittelabbauenden System getrennt ist.

Damit läßt sich auch eine vollkommen unspezifische Induktionswirkung des Phenobarbitals, die den gesamten mikrosomalen Enzymapparat betrifft, ausschließen.

In diesem Zusammenhang ist ferner interessant, daß auch nicht alle steroidhydroxylierenden Enzyme durch Phenobarbital induzierbar sind (50,51).

Es läßt sich also zusammenfassend sagen, daß einerseits

der C-17-Stoffwechsel von Östradiol und Testosteron vollkommen von dem durch Phenobarbital induzierbaren arzneimittelabbauenden Enzymsystem getrennt ist und andererseits arzneimittelabbauendes Enzymsystem und Steroidhydroxylasen nicht vollständig identisch sind.

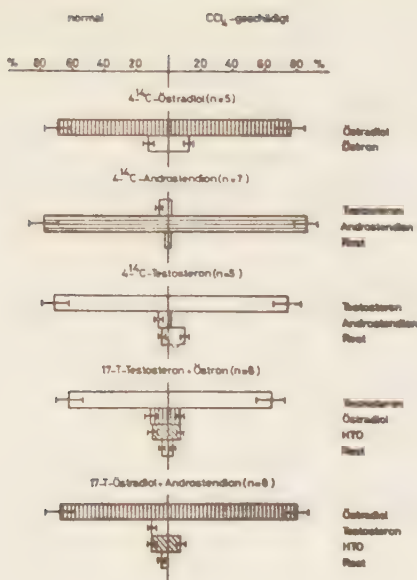


Abb.1

Ergebnisse der Inkubationen mit aus CCl₄-vorbehandelten männlichen Ratten stammenden Leberschnitten.

Inkubationsdauer 30 Minuten. n = 14. Prozentangaben in Prozent der eingesetzten Aktivität. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ s. In der Fraktion "Rest" sind folgende identifizierte Metaboliten enthalten: 5 β -Androstan-3 α ol-17 β ol, 5 α -Androstan-3 β ol-17 β ol, 5 β -Androstan-3 α ol-17on, und 5 β -Androstan-3 β ol-17on. Ferner enthält diese Fraktion einen nicht identifizierten Metaboliten.

Die Versuchsansätze enthielten jeweils 100 mg Leberschnitte, 4 ml Ringerphosphat-Puffer (pH 7,4) und 4,2 μ Mol/L des ¹⁴C-markierten Steroids, bzw. 12,5 μ Mol/L des 17-T-markierten Steroids und 87 μ Mol/L unmarkiertes Steroid.

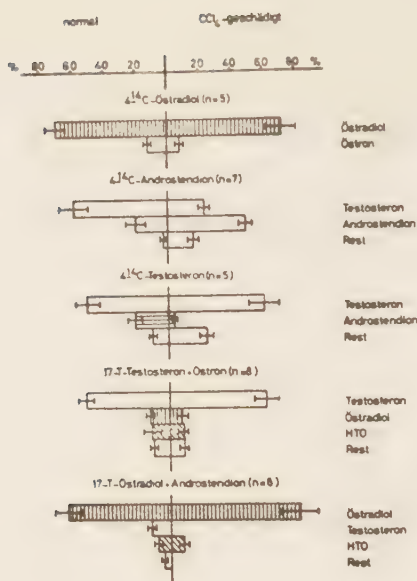


Abb.2

Ergebnisse der Inkubationen mit aus CCl_4 -vorbehandelten männlichen Ratten stammendem Leberhomogenat.

Inkubationsdauer 30 Minuten. n = 14. Prozentangaben in Prozent der eingesetzten Aktivität. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ s. In der Fraktion "Rest" sind folgende identifizierte Metaboliten enthalten: 5β -Androstan- 3α ol- 17β ol, 5α -Androstan- 3β ol- 17β ol, 5β -Androstan- 3α ol- 17α ol und 5β -Androstan- 3β ol- 17α ol. Ferner enthält diese Fraktion einen nicht identifizierten Metaboliten.

Die Versuchsansätze enthielten jeweils Homogenat entsprechend 100 mg Leber, 4 ml Ringerphosphat-Puffer (pH 7,4) und $4,2\mu\text{Mol/L}$ des ^{14}C -markierten Steroids, bzw. $12,5\mu\text{Mol/L}$ des 17-T-markierten Steroids und $87\mu\text{Mol/L}$ unmarkiertes Steroid.

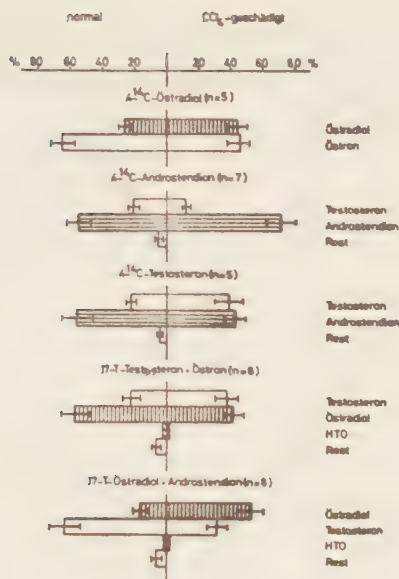


Abb.3

Ergebnisse der Inkubationen mit aus CCl_4 -vorbehandelten männlichen Ratten stammenden Lebermikrosomen.

Inkubationsdauer 30 Minuten. n = 14. Prozentangaben in Prozent der eingesetzten Aktivität. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ s. In der Fraktion "Rest" sind folgende identifizierte Metaboliten enthalten: 5β -Androstan- 3α ol- 17β ol, 5α -Androstan- 3β ol- 17β ol, 5β -Androstan- 3α ol- 17α on und 5β -Androstan- 3β ol- 17α on. Ferner enthält diese Fraktion einen nicht identifizierten Metaboliten.

Die Versuchsansätze enthielten jeweils Mikrosomen entsprechend 100 mg Leber, 4 ml Ringerphosphat-Puffer (pH 7,4) und $4,2\mu\text{Mol/L}$ des ^{14}C -markierten Steroids, bzw. $12,5\mu\text{Mol/L}$ des 17-T-markierten Steroids und $87\mu\text{Mol/L}$ unmarkiertes Steroid.

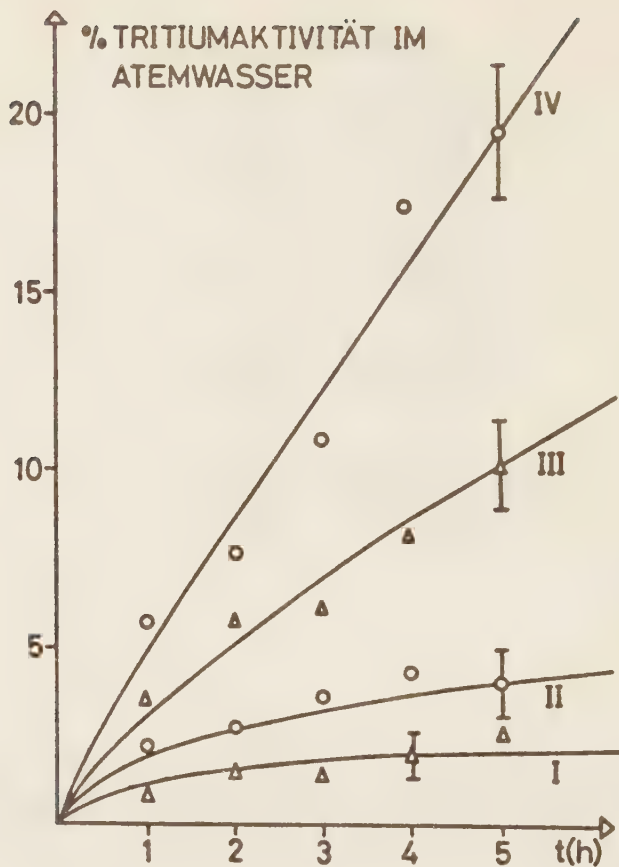


Abb.4

Verlauf der Tritiumaktivität im Atemwasser von männlichen und weiblichen Ratten ohne (Kurven I und II) und nach (Kurven III und IV) Phenobarbitalvorbehandlung nach i.m. Injektion von 6,7-T-Östradiol. $n = 12$. Angabe ist der Mittelwert $\pm$ s. Abszisse: Stunden nach Injektion, Ordinate: Tritiumaktivität in % der eingesetzten Aktivität.

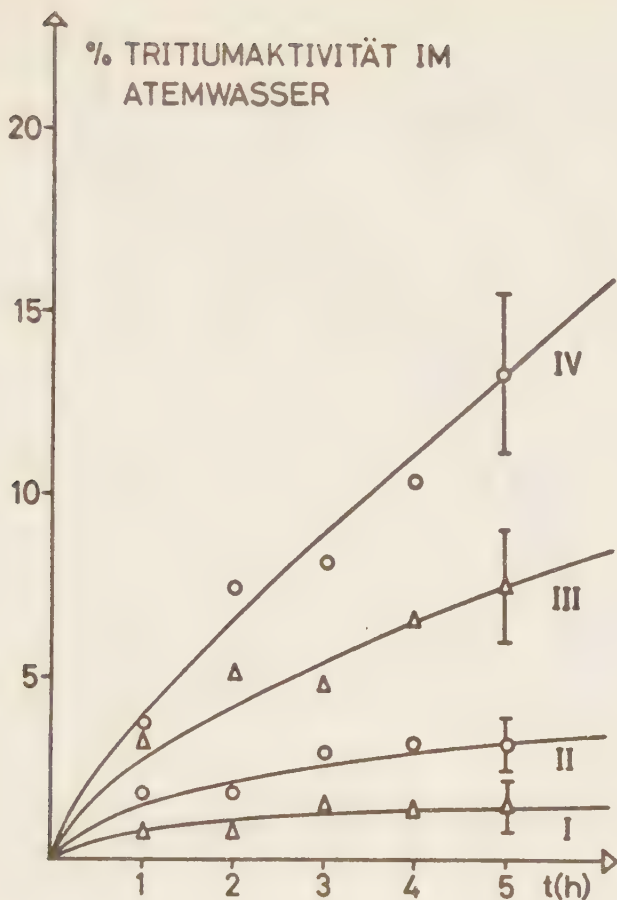


Abb.5

Verlauf der Tritiumaktivität im Atemwasser von männlichen und weiblichen Ratten ohne (Kurven I und II) und nach (Kurven III und IV) Phenobarbitalvorbehandlung nach i.m. Injektion von 7-T-Testosteron. $n = 12$. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ s. Abszisse: Stunden nach Injektion, Ordinate: Tritiumaktivität in % der eingesetzten Aktivität.

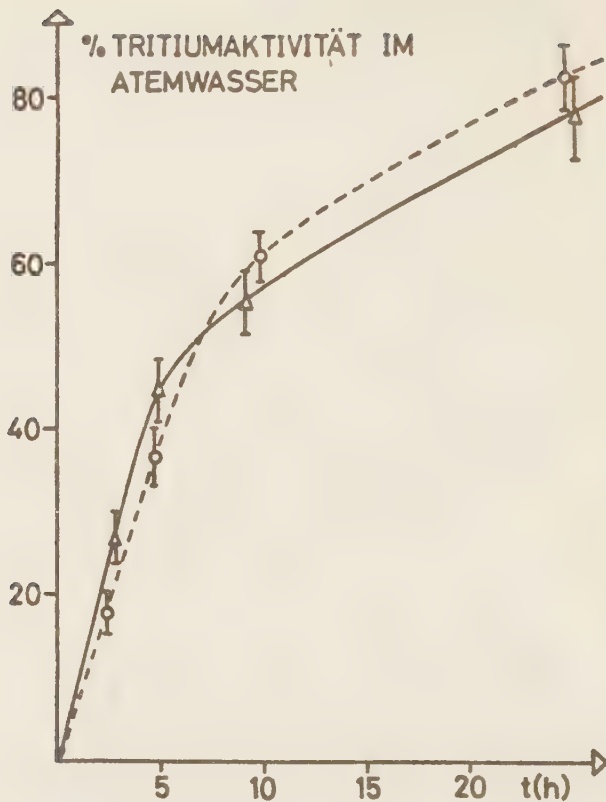


Abb. 6

Verlauf der Tritiumaktivität im Atemwasser von unvorbehandelten männlichen Ratten nach Injektion von 17α -T-Östradiol (gestrichelte Kurve) und 17α -T-Testosteron (ausgezogene Kurve). $n = 14$. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ s. Die Kurvenverläufe sind identisch mit den bei unvorbehandelten weiblichen Tieren gewonnenen Werten und wurden durch Vorbehandlung mit Phenobarbital oder CCl_4 nicht verändert.

			+ 166		
			μ Mol/L NAD	μ Mol/L NAD	μ Mol/L NADP
normale Mikrosomen	+ 73,5 μ Mol/L Östradiol	-	1,39 $\pm$ 0,08	3,4 $\pm$ 0,6	0,08 $\pm$ 0,01
	+ 69,5 μ Mol/L Testosteron	-	0,33 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,1	0,03
normales Cytoplasma	+ 73,5 μ Mol/L Östradiol	0,14 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,06	0,03
	+ 69,5 μ Mol/L Testosteron	0,08 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,06	0,02
Geschädigte Mikrosomen	+ 73,5 μ Mol/L Östradiol	-	0,2 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,1	0,02
	+ 69,5 μ Mol/L Testosteron	-	0,13 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02	0,01
Geschädigtes Cytoplasma	+ 73,5 μ Mol/L Östradiol	0,02	0,65 $\pm$ 0,09	1,1 $\pm$ 0,2	0,06 $\pm$ 0,01
	+ 69,5 μ Mol/L Testosteron	0,02	0,38 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,2	0,04

Tab.1

μ Mol/L/min reduziertes Coenzym gebildet durch aus der Leber männlicher Ratten nach CCl₄-Vorbehandlung gewonnene Zellfraktionen. Im Versuchsansatz sind Zellfraktionen entsprechend 50 mg Leber enthalten. n = 8. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ s.

Tab.2

Bildung verschiedener Metaboliten in aus männlichen Ratten stammendem Leberhomogenat nach Vorbehandlung mit Phenobarbital bzw. CCl_4 . Angegeben ist der Mittelwert $\pm s$ in Prozenten der Gesamtausbeute. n = 12.

Vorbehandlung	keine		CCl_4		Phenobarbital	
Versuchsansätze	2,5 $\mu\text{Mol/L}$ 7- β -Testosteron 87 $\mu\text{Mol/L}$ Östron	2,5 $\mu\text{Mol/L}$ 6,7- β -Östradiol 87 $\mu\text{Mol/L}$ Androstendion	2,5 $\mu\text{Mol/L}$ 7- β -Testosteron 87 $\mu\text{Mol/L}$ Östron	2,5 $\mu\text{Mol/L}$ 6,7- β -Östradiol 87 $\mu\text{Mol/L}$ Androstendion	2,5 $\mu\text{Mol/L}$ 7- β -Testosteron 87 $\mu\text{Mol/L}$ Östron	2,5 $\mu\text{Mol/L}$ 6,7- β -Östradiol 87 $\mu\text{Mol/L}$ Androstendion
HTO	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Östradiol	-	15 $\pm$ 4	-	39 $\pm$ 4	-	31 $\pm$ 4
Östron	-	64 $\pm$ 8	-	40 $\pm$ 6	-	50 $\pm$ 6
Testosteron	26 $\pm$ 4	-	28 $\pm$ 3	-	48 $\pm$ 6	-
3-17-Androstendion	46 $\pm$ 6	-	36 $\pm$ 4	-	27 $\pm$ 4	-
Androstandiole	7 $\pm$ 2	-	16 $\pm$ 2	-	5 $\pm$ 1	-
5 α -Androstandion	-	-	-	-	-	-

Die Fraktion "Androstandiole" enthält die Metaboliten 5 α -Androstandiol(3 α ,17 β), 5 α -Androstandiol(3 β ,17 β) und 5 β -Androstandiol(3 α ,17 β).

Tab.3

Bildung verschiedener Metaboliten in aus weiblichen Ratten stammendem Leberhomogenat nach Vorbehandlung mit Phenobarbital bzw. CCl_4 . Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ s in Prozenten der Gesamtausbeute. n = 12.

Vorbehandlung	keine		CCl_4		Phenobarbital	
Versuchsansätze	2,5 μ Mol/L 6,7-T-Testosteron 87 μ Mol/L Östron	2,5 μ Mol/L 6,7-T-Östradiol 87 μ Mol/L Androstendion	2,5 μ Mol/L 7-T-Testosteron 87 μ Mol/L Östron	2,5 μ Mol/L 6,7-T-Östradiol 87 μ Mol/L Androstendion	2,5 μ Mol/L 7-T-Testosteron 87 μ Mol/L Östron	2,5 μ Mol/L 6,7-T-Östradiol 87 μ Mol/L Androstendion
HTO	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Östradiol	-	47 $\pm$ 4	-	46 $\pm$ 5	-	45 $\pm$ 7
Östron	-	33 $\pm$ 4	-	34 $\pm$ 3	-	34 $\pm$ 5
Testosteron	20 $\pm$ 4	-	26 $\pm$ 3	-	28 $\pm$ 2	-
3-17-Androstendion	45 $\pm$ 8	-	46 $\pm$ 4	-	38 $\pm$ 4	-
Androstandiole	4 $\pm$ 1	-	2 $\pm$ 1	-	4 $\pm$ 1	-
5 α -Androstandion	14 $\pm$ 4	-	6 $\pm$ 2	-	9 $\pm$ 2	-

Die Fraktion "Androstandiole" enthält die Metaboliten 5 α -Androstandiol(3 α ,17 β), 5 α -Androstandiol(3 β ,17 β) und 5 β -Androstandiol(3 α ,17 β).

Tab.4

R_F-Werte der isolierten Metaboliten.

System I:Cyclohexan/Essigester 1:1

System II:Chloroform/Aceton 9:1

	System I		System II	
	isolierter Metabolit	Referenz-substanz	isolierter Metabolit	Referenz-substanz
Östron	0,72	0,70	0,58	0,60
Östradiol	0,61	0,59	0,35	0,36
Östradioldiacetat	-	-	0,53	0,55
Androstendion	0,50	0,48	0,69	0,71
Testosteron	0,37	0,38	0,45	0,46
Testosteronacetat	-	-	0,77	0,75
5 α -Androstandion	0,84	0,82	0,72	0,70
5 α -Androstandiol -3 α 17 β	0,50	0,48	0,38	0,40
5 α -Androstandiol -3 α 17- β -diacetat	-	-	0,85	0,87
5 α -Androstandiol -3 β 17 β	0,33	0,35	0,36	0,38
5 α -Androstandiol -3 β 17- β -diacetat	-	-	0,95	0,93
5 β -Androstandiol -3 α 17 β	0,20	0,18	0,24	0,26
5 β -Androstandiol -3 α 17- β -diacetat	-	-	0,94	0,91
5 β -Androstan-3 α - ol-17on	0,47	0,45	0,44	0,43
5 β -Androstan-3 α - ol-17on-acetat	-	-	0,70	0,69
5 β -Androstan-3 β - ol-17on	0,67	0,66	0,52	0,49
5 β -Androstan-3 β - ol-17on-acetat	-	-	0,81	0,79

Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit werden die Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff und Phenobarbital auf den Stoffwechsel von Östradiol und Testosteron bei der Ratte beschrieben.
2. Tetrachlorkohlenstoff ruft am mikrosomalen Enzymapparat der Leberzelle degenerative Veränderungen hervor; diese Veränderungen erstrecken sich jedoch nur auf strukturgebundene Enzyme, im Cytoplasma lokalisierte Enzyme sind davon nicht betroffen. Dies zeigt sich dadurch, daß die in mikrosomalen Enzymsystemen lokalisierten Reaktionen in der Regel nach Tetrachlorkohlenstoffvorbehandlung stark vermindert ablaufen, während die von cytoplasmatischen Enzymen abhängigen Reaktionen unverändert bzw. verstärkt ablaufen.
3. Die Oxidation von Östradiol und Testosteron an C-17 verringert sich durch die CCl_4 -Vorbehandlung bei männlichen Ratten in vitro deutlich. Bei weiblichen Ratten ist diese Veränderung in vitro nicht nachzuweisen. In vivo ist bei beiden Geschlechtern keine Verringerung der Oxidation an C-17 nachweisbar.
4. Die Hydroxylierung von Östradiol und Testosteron an C-6 bzw. C-7 läßt sich durch Vorbehandlung mit Phenobarbital in vivo steigern. Das Ausmaß dieser Enzyminduktion ist geschlechtsabhängig. Bei weiblichen Ratten ist die Steigerung der Hydroxylierung erheblich größer als bei männlichen Ratten.
5. Die Induktionswirkung des Phenobarbitals auf mikrosomale Enzyme erstreckt sich nicht auf die 17β -Steroiddehydrogenase.

Literatur

- 1 M.Wenzel, H.Kleuker u. P.E.Schulze: Verfolgung der in vivo-Oxidation von 17-Hydroxy- zu 17-Ketosteroiden durch Messen der Tritiumaktivität im Körperwasser.
Z.f.Naturforschung 21, 1178 (1966)
- 2 N.Face u. E.Rathbun: Studies on body composition.
J.biol.Chem. 158, 685 (1945)
- 3 M.Wenzel, K.U.Blum u. E.Kraas: Die Inaktivierung von Östradiol durch Oxidation nach Leberschädigung bei Ratten und bei leberkranken Patienten.
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 6, 265 (1968)
- 4 J.J.Grayhack u. W.W.Scott: Observation on the Inactivation of Testosterone propionate by the liver of the white rat.
Endocrinology 48, 453 (1951)
- 5 M.Wenzel u. K.Follow: Die Reduktion von Androgenen durch 17- α -T-Östradiol.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348, 1667 (1967)
- 6 T.F.Slater: Necrogenic action of CCl_4 .
Nature 209, 36 (1966)
- 7 R.O.Recknagel u. A.K.Ghoshal: New data on the question of lipoperoxidation in carbon tetrachloride poisoning.
Exp.Mol.Path. 5, 108 (1966)
- 8 R.O.Recknagel u. A.K.Ghoshal: Lipoperoxidation as a vector of carbon tetrachloride hepatotoxicity.
Lab.Invest. 15, 132 (1966)
- 9 H.Remmer u. M.Siebert: Kumulation und Elimination von Phenobarbital.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path. 243, 479 (1962)
- 10 J.W.Gibb u. T.M.Brody: The protective effect of nicotinamide on CCl_4 induced hepatotoxicity.
Biochem.Pharmacol. 16, 2047 (1967)
- 11 K.Beck, H.A.Kühn u. B.Nourai: Zur Frage der Glucuronidbildung bei toxischen Schädigungen der Leber.
Acta Hepato-Splenologica 14, 280 (1967)
- 12 R.Nilius u. F.W.Rath: β -Glucuronidase bei chronischer Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Rattenleber.
Z.ges.exp.Med. 146, 366 (1968)
- 13 H.A.Sasame, J.A.Castro u. J.R.Gillette: Studies on the destruction of liver microsomal cytochrome P 450 by carbon tetrachloride administration.
Biochem.Pharmacol. 17, 1759 (1968)

- 14 W.Klinger, A. Neugebauer u. F. K. Splinter: Veränderungen der Biotransformation von Ihenazon, Aminophenazon und Kodein als Zeichen der Frühschädigung der Rattenleber nach Tetrachlorkohlenstoffapplikation.
Arch. Toxikol. 23, 178 (1968)
- 15 G. Pincus u. D. W. Martin: Liver damage and estrogen inactivation.
Endocrinology 27, 838 (1940)
- 16 N. E. Talbot: The inactivation of endogenous estrogen by the liver.
Endocrinology 25, 601 (1939)
- 17 M. U. Dianzani: Content and distribution of Fyridine nucleotides in fatty livers.
Biochem. Biophys. Acta 17, 391 (1955)
- 18 G. M. Tomkins: A mammalian β - α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.
J. biol. Chem. 218, 437 (1956)
- 19 R. O. Recknagel: Carbon tetrachloride hepatotoxicity.
Pharm. Rev. 19, 145 (1967)
- 20 R. Nilius u. F. W. Rath: β -Glucuronidase bei akuter Tetrachlorkohlenstoffschädigung der Rattenleber.
Z. ges. exp. Med. 144, 157 (1967)
- 21 M. S. Biskind u. G. R. Biskind: Inactivation of Testosterone propionate in the liver during Vitamin B complex deficiency. Alteration of the estrogen-androgen equilibrium.
Endocrinology 32, 97 (1943)
- 22 M. Wenzel u. E. Kraas: Beeinträchtigt die Kapazität der 17- β -Steroiddehydrogenase den in vivo-Umsatz von Östradiol zu Östron?
Acta Endocrinologica 56, 385 (1967)
- 23 E. L. Rubin u. R. I. Dorfman: In vitro Conversion of Testosterone to 17- β -Hydroxyandrostan-3-one.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 91, 585 (1956)
- 24 M. Wenzel, L. Pitzel u. P. E. Schulze: Radiospirometrische Messungen über Resorption und Depotwirkung mit "stoffwechsel-labil" markierten Steroidestern.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 341 (1969)
- 25 W. Sandritter: Histopathologie S. 135
Stuttgart-New York (1968)
- 26 B. Hurlock u. P. Talalay: Microsomal 3α - and 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenases.
Arch. Biochem. 80, 468 (1959)

- 27 H.Remmer u.H.J.Merker:Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmatic reticulum and drug metabolizing enzymes.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 123,79 (1965)
- 28 T.R.Tephly u.G.J.Mannering:Inhibition of drug metabolism. Mol.Pharm. 4,10 (1968)
- 29 S.Orrenius,L.Ernster u.S.Dallner:Inhibition of the TPNH-linked lipid peroxidation of liver microsomes by drugs undergoing oxidative demethylation.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 14,329 (1964)
- 30 R.W.Estabrook,D.Y.Cooper u.O.Rosenthal:The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C-21-hydroxylase system of the adrenal cortex.
Biochem.Z. 338,741 (1963)
- 31 B.L.Rubin,H.J.Strecker u.E.B.Koff:Further observations on sex-influenced activity of 3β -hydroxysteroid-dehydrogenase of rat liver.
Endocrinology 72,764 (1963)
- 32 O.Hayaishi:Enzymic hydroxylation.
Ann.Rev.Biochem. 38,21 (1969)
- 33 E.Forchielli u.R.I.Dorfman:Separation of Δ_4 -5 α - and Δ_4 -5 β -Hydrogenases from rat liver homogenates.
J.biol.Chem. 223,443 (1956)
- 34 B.L.Rubin u.H.J.Strecker:Further studies on the sex difference in 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity of rat livers.
Endocrinology 69,257 (1961)
- 35 A.H.Conney u.A.Klutch:Increased activity of androgen hydroxylases in liver microsomes of rats pretreated with Phenobarbital and other drugs.
J.biol.Chem. 238,1611 (1963)
- 36 R.Kuntzmann,M.Jacobson,K.Schneidmann u.A.H.Conney:Similarities between oxidative drug metabolizing enzymes and steroid hydroxylases in liver microsomes.
J.Pharm.exp.Ther. 146,280 (1964)
- 37 R.E.Stitzel,T.R.Tephly u.G.J.Mannering:Inhibition of hexobarbital metabolism in the isolated perfused liver of the rat.
Mol.Pharm. 4,15 (1968)

- 38 H.Jick u.L.Shuster:The turnover of Microsomal Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Cytochrome C Reductase in the livers of Mice treated with phenobarbital.
J.biol.Chem. 241,317 (1966)
- 39 A.H.Conney:Pharmacological Implications of Microsomal Enzyme Induction.
Pharm.Rev. 19,317 (1967)
- 40 B.L.Rubin:Sex difference in orientation of reduction products of 3-Keto-C₁₉ Steroids by rat liver homogenates.
J.biol.Chem. 227,917 (1957)
- 41 J.Seiffert,H.Greim u.P.Chandra:Die Wirkung von Phenobarbital auf die Ribosomenfraktion der Rattenleber.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349,1179 (1968)
- 42 L.Shuster u.H.Jick:The turnover of microsomal protein in the livers of phenobarbital-treated mice.
J.biol.Chem. 241,5361 (1966)
- 43 R.Kato u.J.R.Gillette:Effect of starvation on NADPH-dependent enzymes in liver microsomes of male and female rats.
J.Pharmacol.exp.Ther. 150,279 (1965)
- 44 J.K.Inscoe u.J.Axelrod:Some factors affecting glucuronide formation in vitro.
J.Pharmacol.exp.Ther. 129,128 (1960)
- 45 K.J.Isselbacher u.E.A.Mc Carthy:Effect of carbon tetrachloride upon glucuronide formation by guinea pig liver.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 103,819 (1960)
- 46 G.M.Tomkins:The enzymatic reduction of Δ_4 - β -en ketosteroids.
J.biol.Chem. 225,13 (1957)
- 47 G.M.Tomkins:Enzymatic metabolism of corticosteroids.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 82,836 (1959)
- 48 A.H.Conney,C.Davison,R.Gastel u.J.J.Burns:Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by Phenobarbital and other drugs.
J.Pharmacol.exp.Ther. 130,1 (1960)
- 49 S.Wolf:Pers.Mitteilung
- 50 K.Einarsson u.G.Johansson:Effect of phenobarbital on the Conversion of Cholesterol to Taurocholic Acid.
Europ.J.Biochem. 6,293 (1968)

- 51 M.Suzuki,K.A.Mitropoulos u.N.B.Myant:The electron transport mechanism associated with 12- α -hydroxylation of C-27-steroids.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 30,516 (1968)
- 52 S.Orrenius u.L.Ernster:Proc.Seventh International Congress of Biochemistry,Tokyo 1967 S.227
- 53 A.H.Conney,K.Scheidmann,M.Jacobson u.R.Kuntzmann:Drug induced changes in steroid metabolism.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 123,98 (1965)
- 54 H.Schriebers,W.Cremer u.M.Otto:Sexualcharakteristika des Stoffwechsels von Testosteron in der perfundierten Rattenleber.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348,183 (1967)
- 55 W.Kunz u.B.Schnieders:RNA Metabolism and Induction of Extramicrosomal Enzymes during Liver enlargement due to drugs.
Proc.of the IV.Internat.Congress on Pharmacology,
Basel 1969,Schwabe & Co.

Lebenslauf

Am 23.11.1944 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Gerhart Köster und seiner Ehefrau Lucie in Schmolde, Kreis Pritzwalk geboren. Von 1950 an besuchte ich in Berlin die Grundschule und ein neusprachliches Gymnasium, an dem ich 1964 die Reifeprüfung ablegte. Zum Wintersemester 1964/65 begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Humanmedizin und legte im September 1970 das medizinische Staatsexamen ab. Meine chirurgische Medizinalassistentenzeit leistete ich im Städtischen Wenckebach Krankenhaus bei Herrn Chefarzt Dr. Kussin ab und arbeitete anschließend für vier Monate im Institut für Anästhesiologie im Klinikum Steglitz bei Herrn Prof. Kolb. Während der internen Medizinalassistentenzeit arbeitete ich im Klinikum Westend auf den Abteilungen von Frau Prof. Alexander und Frau Prof. Ibe.

